

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003 年 8 月 21 日 (21.08.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/068259 A1

- (51) 国際特許分類⁷: A61K 39/395, (74) 代理人: 社本 一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.); 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/01562
- (22) 国際出願日: 2003 年 2 月 14 日 (14.02.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-36244 2002 年 2 月 14 日 (14.02.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 水嶋 秀文 (MIZUSHIMA, Hidefumi) [JP/JP]; 〒171-8545 東京都豊島区高田3丁目41番8号 中外製薬株式会社内 Tokyo (JP). 宮内 英一 (MIYAUCHI, Eiichi) [JP/JP]; 〒104-8301 東京都中央区京橋2丁目1番9号 中外製薬株式会社内 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ANTIBODY-CONTAINING SOLUTION PHARMACEUTICALS

(54) 発明の名称: 抗体含有溶液製剤

(57) Abstract: Antibody-containing solution pharmaceuticals comprising an organic acid and a surfactant as a stabilizer; a method of inhibiting the formation of insoluble minute particles and insoluble foreign matter attributed to metal ions contained in the antibody-containing solution pharmaceuticals, which comprises adding an organic acid to the solution; a method of inhibiting the formation of insoluble minute particles and insoluble foreign matter during the shaking and freezing/thawing of the antibody-containing solution, which comprises adding a surfactant to the solution; and a method of stabilizing the antibody-containing solution, which comprises adding an organic acid and a surfactant to the solution.

(57) 要約:

安定化剤として有機酸及び界面活性剤を含む抗体含有溶液製剤; 溶液中に有機酸を添加することを含む、抗体含有溶液製剤中の金属イオンに起因する不溶性異物、不溶性微粒子の生成を抑制する方法; 溶液中に界面活性剤を加することを含む、抗体含有溶液の振とう及び凍結融解時における不溶性異物、不溶性微粒子の生成を抑制する方法; 及び有機酸及び界面活性剤を添加することを含む、抗体含有溶液の安定化方法。

WO 03/068259 A1

明細書
抗体含有溶液製剤

技術分野

- 5 本発明は安定な抗体含有溶液製剤に関する。

背景技術

- 10 遺伝子組換え技術の発達によって、免疫グロブリン、モノクローナル抗体、ヒト型化抗体等の抗体を医薬品として利用することが可能となってきた。これらを安定した供給量で提供するためには、抗体の構造及び活性を保持しうる製造条件及び保存条件を確立することが必要とされている。

- 15 一般に、タンパク質を高濃度溶液にて保存する場合、不溶性凝集体の生成を始めるとする劣化現象が問題となり、それを防止する必要がある。例えば、本出願人は、抗HM1.24抗体が骨髄腫細胞に対して治療効果を有することを見だし（特開平11-092399号）、この抗体について製剤化を検討してきた。抗HM1.24抗体は不安定なタンパク質であり、精製工程において実施するウイルス除去及び除菌のための濾過ストレス、濃縮ストレス、熱ストレス、光ストレスなどによって会合、凝集などの物理的、化学的变化を生じやすい。

- 20 さらに、遺伝子工学的手法で抗体を得るときには、抗体産生細胞をバルク培養し、精製して得られた抗体含有溶液を凍結して保存し、製剤化の段階で融解する。このような振とうや凍結融解を繰り返す過程で抗体会合体や不溶性微粒子が生成したり、また長期保存中に抗体が分解されて分解物が生じ、結果として抗体の残存率が低下することが問題であった。

- 25 また、製造工程中に混入する金属イオン（Feイオン）に起因して不溶性異物、微粒子が生成するという問題があった。金属イオン（Feイオン）は溶液中に極微量に存在することで不溶性異物、不溶性微粒子の生成に起因するため、完全な除去が必要となるが、沈殿法、錯体形成などでは限界があり、金属イオン存在下においても不溶性異物、微粒子を生成しないための手段が求められている。

タンパク質を溶液状態にて保存する方法については、これまでに多くの検討が

なされており、化学的、物理的变化を抑制するための安定化剤としてヒト血清アルブミンあるいは精製ゼラチンなどのタンパク質といった高分子類或いはポリオール類、アミノ酸及び界面活性剤等といった低分子類を添加することによる安定化効果が見出されている。しかしながら、タンパク質のような生体由来の高分子を安定化剤として添加することは、ウイルスやプリオン等のコンタミを除去するなどのために非常に煩雑な工程を必要とするなどの問題があった。また、低分子類の添加についても、添加する成分はなるべく少ない方が好ましい。

抗体の凍結乾燥製剤の安定化については、安定化剤として糖又はアミノ糖、アミノ酸、及び界面活性剤を含有する凍結乾燥製剤が報告されている（特表 2001-503781号）。

しかし、使用前に溶解再構成する必要がなく、使用勝手のよい溶液製剤に対する需要が大きく、安定な抗体含有溶液製剤が求められていた。

発明の開示

本発明の目的は、抗体含有溶液製剤を製造する過程の凍結融解などの物理的ストレス及び長期保存における抗体の凝集に起因する不溶性異物、不溶性微粒子の生成を抑制して、さらに製造工程中に混入する金属イオン（Feイオン）に起因する不溶性異物、微粒子の生成を抑制した、長期保存にも安定な抗体含有溶液製剤を提供することである。

上記目的を達成するために鋭意研究した結果、本発明者らは、有機酸の使用により鉄添加時の不溶性異物生成を顕著に抑制することができること、ならびに界面活性剤を添加することにより振とう、凍結融解段階での不溶性異物、不溶性微粒子の生成を極めて顕著に抑制できることを発見して本発明を完成した。

すなわち、本発明は以下のものを提供する。

- (1) 安定化剤として有機酸及び界面活性剤を含む抗体含有溶液製剤。
- (2) 有機酸が酢酸又はクエン酸である (1) に記載の溶液製剤。
- (3) 有機酸が酢酸である (2) に記載の溶液製剤。
- (4) 酢酸濃度が 10～50 mMである (3) に記載の溶液製剤。
- (5) 界面活性剤がポリソルベート 80 又は 20 である (1) に記載の溶液製剤。

(6) 界面活性剤の濃度が0.01～10mg/mLである(5)記載の溶液製剤。

(7) 塩化ナトリウムをさらに含む(1)に記載の溶液製剤。

(8) 抗体が、組換え抗体である(1)～(7)のいずれかに記載の溶液製剤。

5 (9) 抗体が、キメラ抗体、ヒト型化抗体またはヒト抗体である(8)に記載の溶液製剤。

(10) 抗体が、IgGクラスの抗体である(8)又は(9)に記載の溶液製剤。

(11) IgGクラスの抗体がIgG1クラスの抗体である(10)に記載の溶液製剤。

10 (12) 抗体が、抗インターロイキン-6レセプター抗体または抗HM1.24抗体である(1)～(11)のいずれかに記載の溶液製剤。

(13) 抗体が、抗HM1.24抗体である(12)に記載の溶液製剤。

(14) 安定化剤として10～50mMの酢酸及び0.01～10mg/mLのポリソルベート80を含む、抗HM1.24抗体含有溶液製剤。

15 (15) 溶液中に有機酸を添加することを含む、抗体含有溶液製剤中の金属イオンに起因する不溶性異物、不溶性微粒子の生成を抑制する方法。

(16) 溶液中に界面活性剤を加することを含む、抗体含有溶液の振とう及び凍結融解時における不溶性異物、不溶性微粒子の生成を抑制する方法。

(17) 有機酸及び界面活性剤を添加することを含む、抗体含有溶液の安定化方法。

20

発明を実施するための最良の形態

本発明において、抗体含有溶液製剤とは、活性成分として抗体を含み、ヒト等の動物に投与できるように調製された溶液製剤を言い、好ましくは製造過程に凍結乾燥工程を含まないで製造された溶液製剤を言う。

25 本発明では、抗体含有溶液とは、生体由来抗体であるか、あるいは組換え抗体であるかを問わず、いかなる抗体を含む溶液であつてもよく、好ましくは、培養して得られた抗体を含むCHO細胞などの哺乳動物細胞の培養培地、あるいはこれに部分的精製などの一定の処理を施したもの(バルク溶液)、あるいは上記のヒト等の動物に投与できるように調製された溶液製剤である。

本発明において、不溶性微粒子とは、日本薬局方・一般試験法・注射剤の不溶性微粒子試験法に定めるように、 $10\mu\text{m}$ 以上の微粒子性の不溶性異物をいう。不溶性微粒子の測定には顕微鏡、不溶性微粒子捕集用ろ過器及び測定用メンブランフィルターを用いるが、簡便には光遮へい型自動微粒子測定装置によって測定

5 することもできる。

本発明において、不溶性異物とは、ヨーロッパ薬局方、第3版、2.9.20に記載の方法を準用して、容器に入れた溶液製剤を白色光源の直下、黒色背景下で約3000ルクス（2000～3750ルクス）の明るさの位置で肉眼で観察するときに、たやすく検出される不溶性異物をいう。

10 本発明において、会合体、分解物とはそれぞれ製剤の有効成分である抗体分子の会合体及び分解物をいい、その含量は例えば、後述するゲル濾過クロマトグラフィによる面積百分率法により求めることができる。

本発明の溶液製剤に使用される抗体は、所望の抗原と結合する限り特に制限はなく、マウス抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、ヒツジ抗体、キメラ抗体、ヒト型

15 化抗体、ヒト抗体等を適宜用いることができる。抗体は、ポリクローナル抗体であつてもモノクローナル抗体であつてもよいが、均質な抗体を安定に生産できる点でモノクローナル抗体が好ましい。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体は当業者に周知の方法により作製することができる。

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用

20 し、以下のようにして作製できる。すなわち、所望の抗原や所望の抗原を発現する細胞を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞（ハイブリドーマ）をスクリーニングすることによって作製できる。ハイブリドーマの作製は、たとえば、ミルスティンらの方法（Kohler, G. and Milstein, C., *Methods Enzymol.* (1981) 73: 3-46）等に準じて行うことができる。抗原の免疫原性が低い場合には、

25 アルブミン等の免疫原性を有する巨大分子と結合させ、免疫を行えばよい。

また、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた遺伝子組

換え型抗体を用いることができる（例えば、Carl, A. K. Borrebaeck, James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 参照）。具体的には、ハイブリドーマの mRNA から逆転写酵素を用いて抗体の可変領域（V 領域）の cDNA を合成する。目的とする抗体の V 領域をコードする DNA が得られれば、これを所望の抗体定常領域（C 領域）をコードする DNA と連結し、これを発現ベクターへ組み込む。または、抗体の V 領域をコードする DNA を、抗体 C 領域の DNA を含む発現ベクターへ組み込んでもよい。発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。

本発明では、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ（Chimeric）抗体、ヒト型化（Humanized）抗体などを使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウス抗体の重鎖、軽鎖の可変領域とヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常領域からなる抗体であり、マウス抗体の可変領域をコードする DNA をヒト抗体の定常領域をコードする DNA と連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得ることができる。

ヒト型化抗体は、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域（CDR; complementarity determining region）をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている。具体的には、マウス抗体の CDR とヒト抗体のフレームワーク領域（framework region ; FR）を連結するように設計した DNA 配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドから PCR 法により合成する。得られた DNA をヒト抗体定常領域をコードする DNA と連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる（欧州特許出願公開番号 EP 239400、国際特許出願公開番号 WO 96/02576 参照）。CDR を介して連結されるヒト抗体の

FR は、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい (Sato, K. et al., *Cancer Res.* (1993) 53, 851-856)。

- 5 また、ヒト抗体の取得方法も知られている。例えば、ヒトリンパ球を *in vitro* で所望の抗原または所望の抗原を発現する細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えば U266 と融合させ、抗原への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる (特公平 1-59878 参照)。また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を抗原で免疫することで所望の
- 10 ヒト抗体を取得することができる (国際特許出願公開番号 WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735 参照)。
- さらに、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体 (scFv) としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択することができる。選択されたファージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードする DNA 配列を決定することができる。抗原に結合する scFv の DNA 配列が明らかになれば、当該配列を適当な発現ベクターを作製し、ヒト抗体を取得することができる。これらの方法は既に衆知であり、WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172,
- 15 WO 95/01438, WO 95/15388 を参考にすることができる。

- 抗体遺伝子を一旦単離し、適当な宿主に導入して抗体を作製する場合には、適当な宿主と発現ベクターの組み合わせを使用することができる。真核細胞を宿主として使用する場合、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を用いることができる。動物細胞としては、(1) 哺乳類細胞、例えば、CHO, COS, ミエローマ、BHK (baby hamster kidney), HeLa, Vero, (2) 両生類細胞、例えば、アフリカツメガエル卵母細胞、あるいは(3) 昆虫細胞、例えば、sf9, sf21, Tn5 などが知られている。
- 25 植物細胞としては、ニコティアナ (*Nicotiana*) 属、例えばニコティアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) 由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、

例えばサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、糸状菌、例えば、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、例えばアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) などが知られている。原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (*E. coli*)、枯草菌が知られている。これらの細胞に、目的とする抗体遺伝子を形質転換により導入し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することにより抗体が得られる。

本発明の安定化製剤に含まれる抗体としては、抗 IL-6 レセプター抗体、抗 HM1.24 抗原モノクローナル抗体、抗副甲状腺ホルモン関連ペプチド抗体 (抗 PTHrP 抗体) などを挙げることができるが、これに限定されない。

再構成ヒト型化抗体としては、ヒト型化抗 IL-6 レセプター抗体 (hPM-1) (国際特許出願公開番号 WO 92-19759 を参照)、ヒト型化抗 HM1.24 抗原モノクローナル抗体 (国際特許出願公開番号 WO 98-14580 を参照)、ヒト型化抗副甲状腺ホルモン関連ペプチド抗体 (抗 PTHrP 抗体) (国際特許出願公開番号 WO 98-13388 を参照) などが本発明で使用する好ましい抗体としてあげられる。

本発明の溶液製剤に含まれる抗体の免疫グロブリンクラスは何であってもよいが、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 などの IgG が好ましく、IgG1 がさらに好ましい。

本発明の抗体含有溶液あるいは溶液製剤では、有機酸を添加することにより製造工程中に混入する金属イオン (Fe イオン) に起因する不溶性異物、不溶性微粒子の生成を顕著に抑制することができる。有機酸としては酢酸及びクエン酸が好ましく、酢酸がさらに好ましい。これらを混合して用いることもできる。

有機酸の添加は、有機酸緩衝液中に抗体及びその他の成分を溶解することによって行うことができる。酢酸緩衝液及び／又はクエン酸緩衝液 (好ましくはクエン酸ナトリウムの緩衝液) などの溶液製剤の分野で公知の水性緩衝液に抗体及びその他の成分を溶解することによって溶液製剤を調製する。緩衝液の濃度は一般には 1~500 mM であり、好ましくは 5~100 mM であり、さらに好ましくは 10~50 mM である。

本発明の抗体含有溶液製剤は、有機酸を添加することにより、室温 (25℃)

保存下、鉄イオン含有時において、無機酸を添加した抗体含有溶液製剤と比較して、不溶性異物の生成を顕著に抑制できた。

本発明では、界面活性剤を添加することにより、抗体含有溶液製剤の振とう、凍結融解時における不溶性異物、不溶性微粒子の生成を極めて顕著に抑制することができる。界面活性剤としては、非イオン界面活性剤、例えばソルビタンモノカプリレート、ソルビタンモノラウレート、ソルビタンモノパルミテート等のソルビタン脂肪酸エステル；グリセリンモノカプリレート、グリセリンモノミリテート、グリセリンモノステアレート等のグリセリン脂肪酸エステル；デカグリセリルモノステアレート、デカグリセリルジステアレート、デカグリセリルモノリノレート等のポリグリセリン脂肪酸エステル；ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート、ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテート、ポリオキシエチレンソルビタントリオレエート、ポリオキシエチレンソルビタントリステアレート等のポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル；ポリオキシエチレンソルビットテトラステアレート、ポリオキシエチレンソルビットテトラオレエート等のポリオキシエチレンソルビット脂肪酸エステル；ポリオキシエチレングリセリルモノステアレート等のポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステル；ポリエチレングリコールジステアレート等のポリエチレングリコール脂肪酸エステル；ポリオキシエチレンラウリルエーテル等のポリオキシエチレンアルキルエーテル；ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンプロピルエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンセチルエーテル等のポリオキシエチレンポリオキシプロピレンアルキルエーテル；ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル等のポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル；ポリオキシエチレンヒマシ油、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油（ポリオキシエチレン水素ヒマシ油）等のポリオキシエチレン硬化ヒマシ油；ポリオキシエチレンソルビットミツロウ等のポリオキシエチレンミツロウ誘導体；ポリオキシエチレンラノリン等のポリオキシエチレンラノリン誘導体；ポリオキシエチレンステアリン酸アミド等のポリオキシエチレン脂肪酸アミド等のHLB 6～18を有するもの；陰イオン界面活性剤、例

例えばセチル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、オレイル硫酸ナトリウム等の炭素原子数 10～18 のアルキル基を有するアルキル硫酸塩；ポリオキシエチレンラウリル硫酸ナトリウム等の、エチレンオキシドの平均付加モル数が 2～4 でアルキル基の炭素原子数が 10～18 であるポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩；ラウリルスルホコハク酸エステルナトリウム等の、アルキル基の炭素原子数が 8～18 のアルキルスルホコハク酸エステル塩；天然系の界面活性剤、例えばレシチン、グリセロリン脂質；スフィンゴミエリン等のフィンゴリン脂質；炭素原子数 12～18 の脂肪酸のショ糖脂肪酸エステル等を典型的例として挙げるることができる。本発明の製剤には、これらの界面活性剤の 1 種または 2 種以上を組み合わせる添加することができる。本発明の溶液製剤で使用する好ましい界面活性剤は、ポリソルベート 20, 40, 60 又は 80 などのポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルであり、ポリソルベート 20 及び 80 が特に好ましい。また、ポロキサマー（プルロニック F-68（登録商標）など）に代表されるポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコールも好ましい。ポロキサマー 188 が特に好ましい。

界面活性剤の添加量は使用する界面活性剤の種類により異なるが、ポリソルベート 20 又はポロキサマー 188 の場合では、一般には 0.001～100 mg/mL (0.0001～10%) であり、好ましくは 0.005～50 mg/mL (0.0005～5%) であり、さらに好ましくは 0.01～10 mg/mL (0.001～1%) である。さらに好ましくは、200 回/分×30 分の振とう及び -80℃ と 25℃ の凍結融解を 1 回行った後においても、25 μm 以上の不溶性微粒子が 3 個以下に抑制できる 0.025～0.25 mg/mL (0.0025～0.025%) である。ポリソルベート 80 の場合では、0.001～100 mg/mL (0.0001～10%) であり、好ましくは 0.005～50 mg/mL (0.0005～5%) であり、さらに好ましくは 0.01～10 mg/mL (0.001～1%) である。さらに好ましくは、200 回/分×60 分の振とう及び -20℃ と 5℃ の凍結融解を 3 回繰り返した後においても、25 μm 以上の不溶性微粒子が 0 個に抑制でき、さらに不溶性異物の生成も認めない 0.025～1 mg/mL (0.0025～0.1%) である。

本発明の抗体含有溶液製剤には好ましくは安定化剤としてヒト血清アルブミンや精製ゼラチンなどのタンパク質を実質的に含まない。

本発明の抗体含有溶液製剤にはさらに塩化ナトリウムを添加することができる。塩化ナトリウムの添加量は10～300 mM、好ましくは20～200 mMである。

5

本発明の抗体含有溶液製剤のpHは、好ましくはpH4～8であり、さらに好ましくはpH5～7.5である。しかしながら、pHは含まれる抗体により異なり、これらに限定されるものではない。例えば抗体が抗HM1.24抗体であるとき、熱ストレス後の会合体の生成を抑制し、残存率を高く保ち、併せて電荷的ヘテロ分子（脱アミド体等）の生成を抑制する点からはpH5.5～6.5が最も好ましい。各抗体にとっての好ましいpHは後述する実施例に準じた方法により決定することができる。

10

本発明の製剤にはさらに安定化剤として、マンニトール、ソルビトール等の糖アルコール；スクロース、トレハロース等の非還元二糖類、ラフィノース等の非還元三糖類などの非還元オリゴ糖類などの糖類を添加することもできる。

15

本発明の製剤には等張化剤としてさらに、ポリエチレングリコール、デキストラン、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、グルコース、フラクトース、ラクトース、キシロース、マンノース、マルトース、スクロース、トレハロース、ラフィノースなどの糖類を用いることができる。

20

本発明の抗体含有溶液製剤には、所望によりさらに希釈剤、溶解補助剤、賦形剤、pH調整剤、無痛化剤、緩衝剤、含硫還元剤、酸化防止剤等を含むてもよい。例えば、含硫還元剤としては、N-アセチルシステイン、N-アセチルホモシステイン、チオクト酸、チオジグリコール、チオエタノールアミン、チオグリセロール、チオソルビトール、チオグリコール酸及びその塩、チオ硫酸ナトリウム、グルタチオン、並びに炭素原子数1～7のチオアルカン酸等のスルフヒドリル基を有するもの等が挙げられる。また、酸化防止剤としては、エリソルビン酸、ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール、 α -トコフェロール、酢酸トコフェロール、L-アスコルビン酸及びその塩、L-アスコルビン酸パルミテート、L-アスコルビン酸ステアレート、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫

25

酸ナトリウム、没食子酸トリアミル、没食子酸プロピルあるいはエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム（EDTA）、ピロリン酸ナトリウム、メタリン酸ナトリウム等のキレート剤が挙げられる。さらには、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、炭酸水素ナトリウムなどの無機塩；クエン酸ナトリウム、クエン酸カリウム、酢酸ナトリウムなどの有機塩などの通常添加される成分を含んでいてよい。

本発明の抗体含有溶液製剤は通常非経口投与経路で、例えば注射剤（皮下注、静注、筋注、腹腔内注など）、経皮、経粘膜、経鼻、経肺などで投与されるが、経口投与も可能である。

10 本発明の抗体含有溶液製剤は、通常密封、滅菌されたプラスチック又はガラス製のバイアル、アンプル、注射器のような規定容量の形状の容器、ならびに瓶のような大容量の形状の容器で供給することができる。使用の便宜性の点からはプレフィルドシリンジが好ましい。

15 本発明の製剤中に含まれる抗体の量は、治療すべき疾患の種類、疾患の重症度、患者の年齢などに応じて決定できるが、一般には0.1～200mg/ml、好ましくは1～120mg/mlである。

20 本発明の抗体含有溶液製剤は、後述の実施例に示すように、有機酸、特に酢酸、クエン酸を抗体溶液に添加することにより、鉄添加時の不溶性異物生成を顕著に抑制することが確認された。従って、有機酸を添加することにより、製造工程中に混入する金属イオン（Feイオン）に起因する不溶性異物、微粒子の生成を抑制することが可能となる。さらに本発明の抗体含有溶液製剤は、界面活性剤を添加することによって振とう、凍結融解による不溶性異物、不溶性微粒子の生成を顕著に抑制することができた。

25 本発明を以下の実施例によってさらに詳しく説明するが、本発明の範囲はこれに限定されない。本発明の記載に基づき種々の変更、修飾が当業者には可能であり、これらの変更、修飾も本発明に含まれる。

実施例

抗体試料

WO 03/068259

PCT/JP03/01562

ヒト型化抗HM1.24抗原モノクローナル抗体として、国際特許出願公開番号WO98-35698の参考例2.に記載された方法に準じて作製した抗体(以下、抗HM1.24抗体という)を用いた。

本実施例で用いた抗HM1.24抗体はIgG1クラスの抗体である。

5 試験方法

(1) ゲルろ過クロマトグラフィ (GPC)

抗体の会合体、分解物を分子量の違いにより分離する。本抗体では、二量体、三量体等を合わせて会合体、2種類生成する低分子分解物を分解物1、分解物2と呼ぶ。また、メインピークの残存率についても着目した。

- 10 含量については Initial 品に対する残存率 (%) を指標とした。また、会合体及び分解物はパーセントにて表示した。

GPC 条件

カラム : TSK gel G3000SWXL (TOSOH)

ガードカラム : TSK guard column SWXL (TOSOH)

- 15 カラム温度 : 25°C付近の一定温度

移動相 : 50mM リン酸緩衝液 (pH7.0) - 300mM 塩化ナトリウム

流速 : 約 0.5mL/min

測定波長 : 280nm

20 濃度算出方法

$$\text{抗HM1.24抗体濃度(mg/mL)} = \frac{\text{標準品濃度} \times \text{抗HM1.24抗体ピーク面積} \times \text{標準品 注入量}}{\text{標準品ピーク面積合計} \times \text{被験物質 注入量}}$$

- 25 加速後の抗HM1.24抗体含量

$$\text{抗HM1.24抗体残存率 (\%)} = \frac{\text{加速後の抗HM1.24抗体含量}}{\text{Initial の抗HM1.24抗体含量}} \times 100$$

$$\text{会合体（分解物の場合も同様）（\%）} = \frac{\text{会合体（分解物）のピーク面積}}{\text{全ピーク面積}} \times 100$$

5 (2) イオン交換クロマトグラフィ (IEC)

抗体の脱アミド化などの劣化により生じる電荷的ヘテロ分子を分離する。メインピークの増減を安定性の指標として用いた。

HPLC 条件

カラム : Poly CAT A (PolyLC Inc.製)

10 ガードカラム : Poly CAT A Javelin guard (PolyLC Inc.製)

カラム温度 : 25 °C 付近の一定温度

流量 : 1 mL/min

測定波長 : 280 nm

移動相 : 次の A 液及び B 液を用い、2 液混合のグラジエントを行う。

15 A 液 : pH 6.1 の 25 mM MES 緩衝液 (0.05% アジ化ナトリウム)

B 液 : pH 6.1 の 250 mM 塩化ナトリウム・25 mM MES 緩衝液 (0.05% アジ化ナトリウム)

測定方法

20 B 液 30% でカラムを平衡化した後、試料溶液を注入した。32 分間で B 液濃度 70 % になるように線形グラジエントを行い、5 分間 B 液濃度 70 % を保持した。B 液濃度 100 % で 5 分間以上カラムを洗浄した後、15 分間以上 B 液 30 % でカラムを平衡化して使用した。

解析方法

25 HPLC により得たクロマトグラムのピーク面積を自動積分法により測定し、面積百分率法によりメインピークの割合 (%) を求めた。

(3) 不溶性微粒子試験

測定方法 : 日局・一般試験法・注射剤の不溶性微粒子試験法・光遮へい型自動微粒子測定装置による方法に準じる。

測定機器 : 光遮へい型自動微粒子測定装置 (HIAC)

WO 03/068259

PCT/JP03/01562

(4) 不溶性異物試験

測定方法： ヨーロッパ薬局方、第3版、2. 9. 20に記載の方法を準用し、
黒色背景下で目視した。

5 実施例1：有機酸添加効果

緩衝成分のみ異なる(リン酸、酢酸、クエン酸)抗 HM1.24 抗体製剤に鉄(FeCl_3)
を添加したときの不溶性異物の生成を不溶性異物試験法に従い、黒色背景下で肉
眼で確認した。なお、試料は室温(約 25℃)で保存した。表1に検討処方、表2
に結果を記載する。

10 表1：検討処方

| Sample No. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-------|-------|-------|-------|---------|---------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|
| 抗 HM1.24 抗体 (mg/mL) | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 |
| Polysorbate80 (%) | 0.025 | 0.025 | 0.025 | 0.025 | 0.025 | 0.025 | 0.025 | 0.025 | 0.025 | 0.025 | 0.025 | 0.025 |
| 緩衝液種 | 酢酸 | 酢酸 | 酢酸 | 酢酸 | リン 酸 | リン 酸 | リン 酸 | リン 酸 | クエ ン酸 | クエ ン酸 | クエ ン酸 | クエ ン酸 |
| 緩衝液濃度 (mM) | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| 塩化ナトリウム (mM) | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| pH | 6.0 | 6.0 | 6.0 | 6.0 | 6.0 | 6.0 | 6.0 | 6.0 | 6.0 | 6.0 | 6.0 | 6.0 |
| FeCl_3 濃度 ($\mu\text{g/L}$) | 0 | 10 | 100 | 1000 | 0 | 10 | 100 | 1000 | 0 | 10 | 100 | 1000 |

表2：鉄(FeCl_3)添加後サンプルの不溶性異物試験結果

| Sample No. | 緩衝剤 | 濃度 | Initial | 1day | 4days | 5days | 6days | 7days | 8days |
|------------|------|----------------------|---------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 酢酸 | 0 $\mu\text{g/L}$ | — | — | — | — | — | ± | — |
| 2 | | 10 $\mu\text{g/L}$ | — | — | ± | ± | + | ± | + |
| 3 | | 100 $\mu\text{g/L}$ | — | — | ± | ± | ± | ± | + |
| 4 | | 1000 $\mu\text{g/L}$ | — | — | ± | ± | ± | ± | + |
| 5 | リン酸 | 0 $\mu\text{g/L}$ | — | — | — | — | — | — | — |
| 6 | | 10 $\mu\text{g/L}$ | — | ± | ± | ± | ± | + | ± |
| 7 | | 100 $\mu\text{g/L}$ | — | — | ± | + | + | + | + |
| 8 | | 1000 $\mu\text{g/L}$ | — | — | ++ | ++ | ++ | +++ | +++ |
| 9 | クエン酸 | 0 $\mu\text{g/L}$ | — | — | — | — | — | — | ± |
| 10 | | 10 $\mu\text{g/L}$ | — | — | — | — | — | ± | + |
| 11 | | 100 $\mu\text{g/L}$ | — | — | — | — | ± | ± | + |
| 12 | | 1000 $\mu\text{g/L}$ | — | — | — | — | — | ± | ± |

異物を認めない —————▶ 顕著に異物を認めた

(判定) (—) < (±) < (+) < (++) < (+++)

上記結果から明らかなように、酢酸、クエン酸を緩衝剤とする抗 HM1.24 抗体製剤はリン酸を緩衝剤とする製剤と比較し、顕著に鉄添加時の不溶性異物の生成を抑制した。

5 実施例 2 ; 界面活性剤添加効果

抗 HM1.24 抗体製剤 (2.5~10mg/mL) の振とう試験、凍結融解試験および保存安定性試験における界面活性剤の添加効果をポリソルベート 80, ポリソルベート 20, ポロキサマー 188 を用いて試験した。

(1) 物理的ストレス試験

- 10 物理的ストレス (振とう、凍結融解) に対する界面活性剤の添加効果を不溶性微粒子或いは不溶性異物生成の観点より試験した。

(1-1) 2.5mg/mL 溶液における試験

以下に評価方法を、表 3 に検討処方及び結果を記載した。

評価サンプル : 2mL 充填/5mL バイアル (Sample13~Sample22)

- 15 評価方法 : 光遮へい型自動微粒子測定装置 (HIAC) による不溶性微粒子試験
評価条件 :

①振とう試験

振とう条件 : 200 Strokes / min. × 30min.

振とう機 : RECIPRO SHAKER SR-I (大洋科学工業)

- 20 ②凍結融解試験

凍結融解条件 : -80℃→25℃ 1 回

WO 03/068259

PCT/JP03/01562

表 3 : 検討処方及び結果

| Sample No. | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 |
|------------------------------------|-------|------|--------|-------|------|--------|-------|------|--------|------|
| 抗 HM1.24 抗体 (mg/mL) | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 |
| Polysorbate80 (%) | 0.025 | 0.01 | 0.0025 | — | — | — | — | — | — | — |
| Polysorbate20 (%) | — | — | — | 0.025 | 0.01 | 0.0025 | — | — | — | — |
| Poloxamer188 (%) | — | — | — | — | — | — | 0.025 | 0.01 | 0.0025 | — |
| 塩化ナトリウム(mM) | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 酢酸緩衝液(mM) | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| pH | 6.0 | 6.0 | 6.0 | 6.0 | 6.0 | 6.0 | 6.0 | 6.0 | 6.0 | 6.0 |
| Initial 品微粒子数 $\geq 10\mu\text{m}$ | 2 | 9 | 6 | 6 | 9 | 3 | 9 | 1 | 5 | 19 |
| (Counts/mL) $\geq 25\mu\text{m}$ | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 振とう試験品微粒子数 $\geq 10\mu\text{m}$ | 78 | 49 | 30 | 66 | 89 | 74 | 131 | 32 | 44 | 5922 |
| (Counts/mL) $\geq 25\mu\text{m}$ | 3 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1485 |
| 凍結融解試験品微粒子数 $\geq 10\mu\text{m}$ | 6 | 1 | 2 | 3 | 2 | 2 | 3 | 2 | 4 | 329 |
| (Counts/mL) $\geq 25\mu\text{m}$ | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 47 |

不溶性微粒子または不溶性異物生成抑制の観点から界面活性剤（ポリソルベート 80、ポリソルベート 20、ポロキサマー 188）の明らかな添加効果を 0.0025
5 ～0.025%の範囲で認めた。

(1-2) 10mg/mL 溶液における試験

以下に評価方法を、表 4 に検討処方及び結果を記載した

評価サンプル：10mL 充填/20mL バイアル (Sample23～Sample28)

10 評価方法：

①光遮へい型自動微粒子測定装置 (HIAC) による不溶性微粒子試験

②EP 法を準用した不溶性異物試験 (黒色背景下)

評価条件：

①振とう試験

15 振とう条件 : 200 Strokes / min. × 60min.

振とう機 : RECIPRO SHAKER SR-I (大洋科学工業)

②凍結融解試験

凍結融解条件：-20℃⇔5℃ 3 回

表 4：検討処方及び結果

| Sample No. | | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 |
|------------------------------|----------------------|-------|---------|--------|-------|------|-----|
| 抗 HM1.24 抗体(mg/mL) | | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Polysorbate80 (%) | | 0 | 0.00025 | 0.0025 | 0.025 | 0.05 | 0.1 |
| 酢酸 (mM) | | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| 塩化ナトリウム(mM) | | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| pH | | 6.0 | 6.0 | 6.0 | 6.0 | 6.0 | 6.0 |
| Initial 品微粒子数 (Counts/mL) | $\geq 10\mu\text{m}$ | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | $\geq 25\mu\text{m}$ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 振とう試験品微粒子数 (Counts/mL) | $\geq 10\mu\text{m}$ | 44079 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| | $\geq 25\mu\text{m}$ | 15699 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 凍結融解 3 回品微粒子数 (Counts/mL) | $\geq 10\mu\text{m}$ | 5054 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | $\geq 25\mu\text{m}$ | 333 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 不溶性 異物試 験 | Initial 品 | — | — | — | — | — | — |
| | 振とう品 | + | — | — | — | — | — |
| | 凍結融解 3 回品 | + | + | — | — | — | — |

＋：異物を認める、－：異物を認めない

不溶性異物、不溶性微粒子生成抑制の観点より、ポリソルベート 80 は 0.0025%
5 ～0.1%の範囲で添加効果を認めた。

(2) 保存安定性試験

5℃保存下において抗 HM1.24 抗体溶液中で経時的に生成する不溶性異物に対
するポリソルベート 80 の抑制効果を試験した。

10 (2-1) 2.5, 5.0mg/mL 溶液における試験

以下に評価方法を、表 5 に検討処方及び結果を記載した。

評価サンプル：5mL 充填/10mL バイアル (Sample 29～Sample 38)

評価方法：EP 法を準用した不溶性異物試験 (黒色背景下)

保存条件：5℃-3M

WO 03/068259

PCT/JP03/01562

表 5：検討処方及び結果

| Sample No. | | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 |
|---------------------|---------|-----|-------|--------|------|-------|-----|-------|-------|------|------|
| 抗 HM1.24 抗体 (mg/mL) | | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 |
| Polysorbate80 (%) | | — | 0.001 | 0.0025 | 0.01 | 0.025 | — | 0.002 | 0.005 | 0.02 | 0.05 |
| 塩化ナトリウム(mM) | | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 酢酸緩衝液(mM) | | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| pH | | 6.0 | 6.0 | 6.0 | 6.0 | 6.0 | 6.0 | 6.0 | 6.0 | 6.0 | 6.0 |
| バイアル ID1 | Initial | — | — | — | — | — | + | — | — | — | — |
| | 3M | + | + | — | — | — | ++ | — | — | — | — |
| バイアル ID2 | Initial | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | 3M | + | — | — | — | — | ++ | — | — | — | + |
| バイアル ID3 | Initial | ++ | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | 3M | + | + | + | — | — | ++ | — | — | + | — |
| バイアル ID4 | Initial | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | 3M | + | + | — | — | — | ++ | + | + | — | — |
| バイアル ID5 | Initial | — | | — | — | — | — | — | — | | — |
| | 3M | + | | — | — | — | ++ | + | — | | — |

++：顕著に異物を認める、+：僅かに異物を認める、—：異物を認めない

- ポリソルベート 80 非添加処方 (Sample 29、34) において、5°C—3 カ月保存後、
- 5 顕著な不溶性異物生成が確認されたが、ポリソルベート 80 添加処方においては 0.001~0.05% の範囲で明らかに生成抑制効果が認められた。

(2-2) 10mg/mL 溶液における試験

試験方法を以下に、検討処方及び結果を表 6 に記載した。

- 10 評価サンプル：10mL 充填/20mL バイアル (Sample 39~Sample 42)

評価方法：EP 法を準用した不溶性異物試験 (黒色背景下)

保存条件：5°C-3, 6, 12M

表 6 検討処方及び結果

| Sample No. | | 39 | 40 | 41 | 42 |
|---------------------|---------|-----|-------|-------|------|
| 抗 HM1.24 抗体 (mg/mL) | | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Polysorbate80 (%) | | 0 | 0.005 | 0.025 | 0.05 |
| 塩化ナトリウム (mM) | | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 酢酸緩衝液 (mM) | | 10 | 10 | 10 | 10 |
| pH | | 6.0 | 6.0 | 6.0 | 6.0 |
| 不溶性異物 試験 | Initial | — | — | — | — |
| | 5°C—3M | + | — | — | — |
| | 5°C—6M | + | — | — | — |
| | 5°C—12M | + | — | — | — |

＋：異物を認める、－：異物を認めない

5 不溶性異物の生成に対し、ポリソルベート 80 を 0.005% 以上添加することで顕著な効果が認められた。

実施例 3：pH 依存性

抗 HM1.24 抗体濃度 2.5～10mg/mL の範囲における至適 pH を確認するため、熱過酷試験、保存安定性試験を行った。

10 (1) 2.5mg/mL 製剤実施例

以下に評価方法を、表 7 に検討処方、表 8 に結果を記載した。

評価サンプル：1mL 充填 / 5mL バイアル (Sample 43～Sample 47)

評価方法：熱過酷試験、保存安定性試験

保存条件：50°C-3M(GPC) 5°C-6M (IEC)

15

20

WO 03/068259

PCT/JP03/01562

表 7 : 検討処方

| Sample No. | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 |
|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 抗 HM1.24 抗体(mg/mL) | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 |
| 酢酸緩衝液(mM) | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| 塩化ナトリウム(mM) | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Polysorbate80 (%) | 0.025 | 0.025 | 0.025 | 0.025 | 0.025 |
| pH | 5.0 | 5.5 | 6.0 | 6.5 | 7.0 |

表 8 : 熱過酷試験 (50°C-3M) 、保存安定性試験 (5 °C-6M) 評価結果

| Sample No. | pH | GPC (50°C-3M) | | | | IEC (5°C-6M) |
|------------|-----|---------------|----------|----------|----------|--------------|
| | | 残存率 (%) | 会合体量 (%) | 分解物1 (%) | 分解物2 (%) | メインピーク(%) |
| 43 | 5.0 | 53.7 | 35.8 | ND | 12.6 | 93.1 |
| 44 | 5.5 | 68.1 | 29.6 | ND | 9.5 | 92.8 |
| 45 | 6.0 | 76.6 | 19.6 | 4.9 | 8.2 | 92.5 |
| 46 | 6.5 | 78.2 | 15.2 | 8.9 | 7.8 | 90.7 |
| 47 | 7.0 | 77.8 | 12.4 | 11.4 | 8.5 | 88.0 |

5 (2) 10mg/mL 製剤実施例

以下に評価方法を、表 9 に検討処方、表 10 に結果を記載した。

評価サンプル : 1mL 充填 / 5mL バイアル (Sample 48~Sample 54)

評価方法 : 熱過酷試験

保存条件 : 50°C-1M(GPC)、40°C-1M (IEC)

10

表 9 : 検討処方

| Sample No. | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 |
|---------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| 抗 HM1.24 抗体 (mg/mL) | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Polysorbate80 (%) | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 |
| 酢酸緩衝液(mM) | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| 塩化ナトリウム(mM) | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| pH | 5.50 | 5.75 | 6.00 | 6.25 | 6.50 | 6.75 | 7.00 |

表 10 : 熱過酷試験 (50°C-1M, 40°C-1M) 評価結果

| Sample No. | pH | GPC (50°C-1M) | | | | IEC(40°C-1M) |
|------------|------|---------------|---------|----------|----------|--------------|
| | | 残存率 (%) | 会合体 (%) | 分解物1 (%) | 分解物2 (%) | メインピーク(%) |
| 48 | 5.50 | 79.1 | 14.5 | 5.4 | 2.5 | 67.2 |
| 49 | 5.75 | 84.2 | 11.3 | 5.8 | 2.3 | 64.4 |
| 50 | 6.00 | 85.6 | 10.0 | 5.9 | 2.2 | 62.5 |
| 51 | 6.25 | 85.5 | 10.1 | 6.1 | 2.2 | 58.5 |
| 52 | 6.50 | 86.8 | 8.6 | 6.5 | 2.2 | 57.8 |
| 53 | 6.75 | 87.1 | 7.9 | 6.8 | 2.2 | 57.0 |
| 54 | 7.00 | 86.5 | 7.7 | 7.6 | 2.5 | 55.0 |

5 以上の結果から、pH5.5～6.5 の範囲で会合体増加、電荷的ヘテロ分子への推移が共に抑制されることを確認した。さらに以下のことが確認された。

- 会合体の生成は低 pH 条件であるほど促進する。
- 分解物 2 の生成は pH にほとんど依存しない。
- 分解物 1 生成は高 pH であるほど促進する。
- I E Cにおけるメインピークは低 pH であるほど残存する。

10

実施例 4 : 塩化ナトリウム濃度依存性

塩化ナトリウム濃度が抗 HM1.24 抗体の安定性に及ぼす効果を熱過酷試験を用いて試験した。

(1) 2.5mg/mL 製剤実施例

15 以下に評価方法を、表 1 1 に検討処方、表 1 2 に結果を記載した。

評価サンプル : 1mL 充填 / 5mL バイアル (Sample 55～Sample 58)

評価方法 : 熱過酷試験

保存条件 : 50°C-3M(GPC)

20

WO 03/068259

PCT/JP03/01562

表 1 1 : 検討処方

| Sample No. | 55 | 56 | 57 | 58 |
|---------------------|-------|-------|-------|-------|
| 抗 HM1.24 抗体 (mg/mL) | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 |
| Polysorbate80 (%) | 0.025 | 0.025 | 0.025 | 0.025 |
| 酢酸緩衝液 (mM) | 20 | 20 | 20 | 20 |
| pH | 6.0 | 6.0 | 6.0 | 6.0 |
| 塩化ナトリウム (mM) | 23 | 100 | 200 | 500 |

表 1 2 : 熱過酷試験 (50°C-3 M) 評価結果

| Sample No. | NaCl 濃度 (mM) | 残存率(%) | 会合体量(%) | 分解物1(%) | 分解物2(%) |
|------------|--------------|--------|---------|---------|---------|
| 55 | 23 | 75.4 | 17.6 | ND | 7.1 |
| 56 | 100 | 76.8 | 15.5 | ND | 7.6 |
| 57 | 200 | 76.5 | 15.8 | ND | 7.8 |
| 58 | 500 | 68.0 | 14.5 | 8.7 | 8.6 |

- 5 塩化ナトリウムを 500mM 添加した試料では、Monomer 残存率の低下が認められたが、それ以外の試料では安定性に差異は確認されなかった。

(2) 10mg/mL 製剤実施例

以下に評価方法を、表 1 3 に検討処方、表 1 4 に結果を記載した。

- 10 評価サンプル： 1mL 充填 / 5mL バイアル (Sample 59~Sample 61)

評価方法：熱過酷試験

保存条件：50°C-1M (GPC)

表 1 3 : 検討処方

| Sample No. | 59 | 60 | 61 |
|--------------------|------|------|------|
| 抗 HM1.24 抗体(mg/mL) | 10 | 10 | 10 |
| Polysorbate80 (%) | 0.05 | 0.05 | 0.05 |
| 酢酸緩衝液 (mM) | 10 | 10 | 10 |
| pH | 6.0 | 6.0 | 6.0 |
| 塩化ナトリウム (mM) | 100 | 150 | 200 |

WO 03/068259

PCT/JP03/01562

表 1 4 : 熱過酷試験 (50°C-1M) 評価結果

| Sample No. | NaCl 濃度 (mM) | 残存率(%) | 会合体量(%) | 分解物 1(%) | 分解物 2(%) |
|------------|--------------|--------|---------|----------|----------|
| 59 | 100 | 90.6 | 7.0 | 4.5 | 1.9 |
| 60 | 150 | 89.2 | 7.6 | 4.5 | 2.0 |
| 61 | 200 | 88.9 | 7.8 | 4.7 | 2.1 |

試験した塩化ナトリウム濃度 23~200mM の範囲において抗 HM1.24 抗体製剤の安定性に差異は認められなかった。

5

実施例 5 : 酢酸濃度依存性

酢酸濃度が抗 HM1.24 抗体の安定性に及ぼす効果を熱過酷試験を用いて試験した。

(1) 10mg/mL 製剤実施例

10 以下に評価方法を、表 1 5 に検討処方、表 1 6 に結果を記載した。

評価サンプル : 1mL 充填 / 5mL バイアル (Sample 59,62,63)

評価方法 : 熱過酷試験

保存条件 : 50°C-1M (GPC)

表 1 5 : 検討処方

| Sample No. | 59 | 62 | 63 |
|---------------------|------|------|------|
| 抗 HM1.24 抗体 (mg/mL) | 10 | 10 | 10 |
| Polysorbate80 (%) | 0.05 | 0.05 | 0.05 |
| 酢酸緩衝液 (mM) | 10 | 20 | 50 |
| pH | 6.0 | 6.0 | 6.0 |
| 塩化ナトリウム(mM) | 100 | 100 | 100 |

15

表 1 6 : 熱過酷試験 (50°C-1M) 評価結果

| Sample No. | 酢酸濃度 (mM) | 残存率(%) | 会合体量(%) | 分解物 1(%) | 分解物 2(%) |
|------------|-----------|--------|---------|----------|----------|
| 59 | 10 | 90.6 | 7.0 | 4.5 | 1.9 |
| 62 | 20 | 89.7 | 7.9 | 4.8 | 2.1 |
| 63 | 50 | 89.0 | 8.3 | 4.9 | 2.1 |

WO 03/068259**PCT/JP03/01562**

以上の結果より、酢酸濃度が 10～50mM の範囲で抗 HM1.24 抗体製剤は安定であることを確認した。

請求の範囲

1. 安定化剤として有機酸及び界面活性剤を含む抗体含有溶液製剤。
2. 有機酸が酢酸又はクエン酸である請求項 1 に記載の溶液製剤。
- 5 3. 有機酸が酢酸である請求項 2 に記載の溶液製剤。
4. 酢酸濃度が 10 ～ 50 mM である請求項 3 に記載の溶液製剤。
5. 界面活性剤がポリソルベート 80 又は 20、あるいはポロキサマーである請求項 1 に記載の溶液製剤。
6. 界面活性剤の濃度が 0.01 ～ 10 mg/mL である請求項 5 に記載の溶液製剤。
- 10 7. 塩化ナトリウムをさらに含む請求項 1 に記載の溶液製剤。
8. 抗体が、組換え抗体である請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載の溶液製剤。
9. 抗体が、キメラ抗体、ヒト型化抗体またはヒト抗体である請求項 8 に記載の溶液製剤。
- 15 10. 抗体が、IgG クラスの抗体である請求項 8 又は 9 に記載の溶液製剤。
11. IgG クラスの抗体が IgG1 クラスの抗体である請求項 10 に記載の溶液製剤。
12. 抗体が、抗インターロイキン-6 レセプター抗体または抗HM1.24 抗体である請求項 1 ～ 11 のいずれかに記載の溶液製剤。
13. 抗体が、抗HM1.24 抗体である請求項 12 に記載の溶液製剤。
- 20 14. 安定化剤として 10 ～ 50 mM の酢酸及び 0.01 ～ 10 mg/mL のポリソルベート 80 を含む、抗HM1.24 抗体含有溶液製剤。
15. 溶液中に有機酸を添加することを含む、抗体含有溶液製剤中の金属イオンに起因する不溶性異物、不溶性微粒子の生成を抑制する方法。
16. 溶液中に界面活性剤を加することを含む、抗体含有溶液の振とう及び凍結融解時における不溶性異物、不溶性微粒子の生成を抑制する方法。
- 25 17. 有機酸及び界面活性剤を添加することを含む、抗体含有溶液の安定化方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/01562

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K39/395, 47/10, 47/04, 47/34, 9/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K39/395, 47/10, 47/04, 47/34, 9/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X Y | WO 00/66160 A1 (Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.), 09 November, 2000 (09.11.00), Particularly, abstract; Claims; page 3, line 25 to page 4, lines 1; 17 to page 5, line 2; table 1; page 10, 1st to 4th lines from the bottom & EP 1174148 A1 | 1-11, 15-17 12-14 |
| X Y | WO 97/45140 A1 (GRAXO GROUP LTD.), 04 December, 1997 (04.12.97), Particularly, abstract; Claims; page 5, lines 7 to 21; example 4 & EP 907378 A1 & US 6252055 B1 & JP 11-512753 A & JP 3338060 B2 & AU 9729589 A1 & AU 731950 B2 & ZA 9704486 A & CN 1219882 A & BR 9709267 A & NZ 332625 A & NO 9805464 A & KR 2000015935 A | 1-11, 15-17 12-14 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

| | | | |
|--------------------------------------|---|--------------------------|--|
| * "A" "E" "L" "O" "P" | Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance earlier document but published on or after the international filing date document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | "I" "X" "Y" "&" | later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art document member of the same patent family |
|--------------------------------------|---|--------------------------|--|

Date of the actual completion of the international search
19 May, 2003 (19.05.03)

Date of mailing of the international search report
03 June, 2003 (03.06.03),

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/01562

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X Y | WO 98/56418 A1 (GENENTECH, INC.), 17 December, 1998 (17.12.98), Particularly, abstract; Claims; page 22, line 9 to page 23, line 2; page 45, line 37 to page 46, line 3 & EP 999853 A1 & EP 999853 B1 & JP 2002-504907 A & AU 9882559 A1 & AU 740284 B2 & AT 230277 E | 1-11, 15-17 12-14 |
| X Y | WO 98/22136 A2 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH), 28 May, 1998 (28.05.98), Particularly, abstract; patentansprüche; page 10, lines 8 to 13; page 11, lines 13 to 29; Beispiel 1-11 & WO 98/22136 A3 & EP 852951 A1 & EP 941121 A2 & JP 2001-503781 A & AU 9854841 A1 & AU 735411 B2 & ZA 9710409 A & CN 1244805 A & BR 9713521 A & MX 9904565 A | 1-11, 15-17 12-14 |
| X Y | WO 97/04801 A1 (GENENTECH, INC.), 13 February, 1997 (13.02.97), Particularly, abstract; Claims; page 14, line 35 to page 15, lines 6; 22 to 34; table 1-8 & EP 845997 A1 & US 6267958 B1 & US 2001/014326 A1 & JP 11-510170 A & CA 2226575 A & AU 9665992 A1 & AU 716785 B2 & CN 1191490 A & BR 9609743 A & NZ 313503 A & NZ 500539 A & IL 122910 A1 & NO 9800335 A | 1-11, 15-17 12-14 |
| Y | EP 960936 A1 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA), 01 December, 1999 (01.12.99), Full text & WO 98/14580 A1 & US 2003/045691 A1 & JP 10-155494 A & ZA 9708865 A & AU 9743992 A1 & AU 715156 B2 & BR 9712488 A & CN 1235639 A & RU 2184147 C2 & NO 9901591 A & KR 2000048884 A & AU 725867 B2 | 12-14 |
| Y | EP 628639 A1 (Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha), 14 December, 1994 (14.12.94), Full text & EP 628639 B1 & WO 92/19759 A1 & US 5795965 A & US 5817790 A & JP 5-236966 A & JP 5-227970 A & JP 2001-083151 A & JP 3370324 B & JP 2000-116391 A & JP 3176598 B & AU 9216740 A1 & AU 668349 B2 & HU 70258 A2 & HU 218140 B & AT 181575 E & ES 2134212 T3 & RU 2139351 C1 & ZA 9203021 A & AU 9656213 A1 & AU 692100 B2 | 12 |

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO3/01562

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ A61K39/395, 47/10, 47/04, 47/34, 9/08

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ A61K39/395, 47/10, 47/04, 47/34, 9/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS(STN), MEDLINE(STN), EMBASE(STN), BIOSIS(STN)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|----------------------|
| X Y | WO 00/66160 A1(山之内製薬株式会社)2000.11.09 特に、Abstract, 請求の範囲, 第3 ^段 -ジ 第25行-第4 ^段 -ジ 第1行, 第4 ^段 -ジ 第17行-第5 ^段 -ジ 第2行, 表 1, 第10 ^段 -ジ 下から第1-4行 & EP 1174148 A1 | 1-11, 15-17 12-14 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー


- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
19.05.03

国際調査報告の発送日
03.06.03

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
濱下 浩一 
電話番号 03-3581-1101 内線 3452

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO3/01562

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|---|----------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| X Y | WO 97/45140 A1(GRAXO GROUP LIMITED)1997.12.04 特に、Abstract, Claims, 第5 [°] -シ 第7-21行, Examlle 4 & EP 907378 A1 & US 6252055 B1 & JP 11-512753 A & JP 3338060 B2 & AU 9729589 A1 & AU 731950 B2 & ZA 9704486 A & CN 1219882 A & BR 9709267 A & NZ 332625 A & NO 9805464 A & KR 2000015935 A | 1-11, 15-17 12-14 |
| X Y | WO 98/56418 A1(GENENTECH, INC.)1998.12.17 特に、Abstract, Claims, 第22 [°] -シ 第9-第23 [°] -シ 第2行, 第45 [°] -シ 第 37行-第46 [°] -シ 第3行 & EP 999853 A1 & EP 999853 B1 & JP 2002-504907 A & AU 9882559 A1 & AU 740284 B2 & AT 230277 E | 1-11, 15-17 12-14 |
| X Y | WO 98/22136 A2(BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 1998.05.28 特に、Abstract, Patentansprüche, 第10 [°] -シ 第8-13行, 第11 [°] -シ 第 13-29行, Beispiel 1-11 & WO 98/22136 A3 & EP 852951 A1 & EP 941121 A2 & JP 2001-503781 A & AU 9854841A1 & AU 735411 B2 & ZA 9710409 A & CN 1244805 A & BR 9713521 A & MX 9904565 A | 1-11, 15-17 12-14 |
| X Y | WO 97/04801 A1(GENENTECH, INC.)1997.02.13 特に、Abstract, Claims, 第14 [°] -シ 第35-第15 [°] -シ 第6行, 第15 [°] -シ 第22-34行, TABLE 1-8 & EP 845997 A1 & US 6267958 B1 & US 2001/014326 A1 & JP 11-510170 A & CA 2226575 A & AU 9665992 A1 & AU 716785 B2 & CN 1191490 A & BR 9609743 A & NZ 313503 A & NZ 500539 A & IL 122910 A1 & NO 9800335 A | 1-11, 15-17 12-14 |

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO3/01562

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|--|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| Y | <p>EP 960936 A1(CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 1999.12.01 文献全体 & WO 98/14580 A1 & US 2003/045691 A1 & JP 10-155494 A & ZA 9708865 A & AU 9743992 A1 & AU 715156 B2 & BR 9712488 A & CN 1235639 A & RU 2184147 C2 & NO 9901591 A & KR 2000048884 A & AU 725867 B2</p> | 12-14 |
| Y | <p>EP 628639 A1(Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha)1994.12.14 文献全体 & EP 628639 B1 & WO 92/19759 A1 & US 5795965 A & US 5817790 A & JP 5-236966 A & JP 5-227970 A & JP 2001-083151 A & JP 3370324 B & JP 2000-116391 A & JP 3176598 B & AU 9216740 A1 & AU 668349 B2 & HU 70258 A2 & HU 218140 B & AT 181575 E & ES 2134212 T3 & RU 2139351 C1 & ZA 9203021 A & AU 9656213 A1 & AU 692100 B2</p> | 12 |